

OREKSYNOWY MECHANIZM KOMÓRKOWEJ AKTYWNOŚCI NEURONALNEJ W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM SSAKÓW

OREXIN MECHANISM OF CELLULAR NEURONAL ACTIVITY IN MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Łukasz CHROBOK, Katarzyna PALUS, Marian H. LEWANDOWSKI

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii, Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Oreksyna A oraz oreksyna B są nowoodkrytymi neuropeptydami o pleiotropowym działaniu w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków. Łączą się z receptorami oreksynowymi: 1 i 2, które należą do rodziny receptorów metabotropowych związanych z białkiem G. Neurony oreksynergiczne można odnaleźć w okolicy bocznego podwzgórza (ang. *lateral hypothalamic area*) i zarówno położenie tych neuronów jak i sama struktura aminokwasowa oreksyn są bardzo konserwatywne w obrębie wielu gatunków kręgowców. Układ oreksynergiczny, rozlegle unerwiający prawie cały mózg, jest uważany za nadrzędny układ niespecyficzny mózgowia, a jego podstawową funkcją jest wzbudzenie (ang. *arousal*) wielu struktur ośrodkowego układu nerwowego ssaków. Molekularny mechanizm działania oreksyn różni się w zależności od struktury docelowej, a ich efektem neurofizjologicznym jest depolaryzacja lub zwiększenie pobudliwości komórki docelowej. Główną ścieżką sygnalizacji wewnątrzkomórkowej aktywowaną przez oreksyny jest szlak: białko G – fosfolipaza C – kinaza białkowa C. Efektem jego aktywacji jest wpływ na wiele kanałów jonowych w błonie komórkowej, takich jak: kanały potasowe (w tym kanały prostownicze zależne od białka G), kanały wapniowe zależne od napięcia, wymiennik sodowo-wapniowy, czy niespecyficzne kanały kationowe, w tym kanały z rodziny TRP oraz kanały jonowe aktywowane hyperpolaryzacją i bramkowane cyklicznymi nukleotydami.

Słowa kluczowe: oreksyny, receptory oreksynowe, G_q , PLC, PKC, kanały jonowe

Summary: Orexin A and orexin B are two newly discovered neuropeptides with pleiotropic function in mammalian central nervous system. They activate two G-protein coupled receptors: orexin receptor 1 and 2. Orexinergic neurons were found in lateral hypothalamic area and both localisation and aminoacids sequence are very conservative among many vertebrates species. Orexinergic system, densely innervating various structures among whole brain, is believed to be the major nonspecific

system, whose main function is arousal. Molecular mechanism varies depending on the brain structure, although the effect of the modulation is either depolarisation, or increasing the neuronal excitability. The main intracellular signalisation pathway, involved in orexins modulation, is connected with G protein – phospholipase C – protein kinase C activation. As the effect of this activation, these neuropeptides can modulate many ionic channels placed in cellular membrane, as: potassium channels (including G-protein dependent inward rectifiers), voltage-dependent calcium channels, sodium-calcium exchanger, or nonspecific cationic channels, like TRPC channels and hyperpolarisation-activated cyclic nucleotides-gated channels.

Key words: orexins, orexin receptors, G_q , PLC, PKC, ion channels

WSTĘP

W 1998 roku, a więc dokładnie 15 lat temu, dwie niezależne grupy badawcze, opublikowały odkrycie dwóch nowych neuropeptydów: oreksyn, zwanych również hipokretynami (nazwy te zarówno w kontekście peptydów, jak i ich receptorów, są używane synonimicznie) [10, 26]. Oreksyna A (OX-A)/hipokretyna-1 (Hcrtr-1) i oreksyna B (OX-B)/hipokretyna-2 (Hcrtr-2) syntetyzowane są przez grupę neuronów zlokalizowanych w bocznym podwzgórzu (ang. *lateral hypothalamus*). Gen prekursora oreksyn położony jest u człowieka na chromosomie 17q21, a jego produktem jest preprooreksyna, która w wyniku proteolizy dzielona jest na dwa funkcjonalne peptydy – OX-A i OX-B. Obie cząsteczki są wysoce konserwatywne wśród wielu gatunków ssaków, a u myszy i szczura są identyczne [10].

Dwa receptory oreksynowe, będące receptorami metabotropowymi sprzężonymi z białkiem G: receptor oreksynowy 1 (OX_1R)/hipokretynowy 1 (Hcrtr-1) i receptor oreksynowy 2 (OX_2R)/hipokretynowy 2 (Hcrtr-2), można odnaleźć w obrębie prawie wszystkich struktur mózgowia [15]. Receptory oreksynowe nie różnią się między sobą tylko powinowactwem do swoich endogennych ligandów (OX-A i OX-B), lecz także rodzajem białka G, z którym się łączą. Jest to niezwykle ważne, ponieważ odmienne białka G, mogą uruchamiać w komórce różne szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, co niesie za sobą odmienne konsekwencje. Pokrywa się to z różną fizjologiczną rolą obu receptorów. OX_1R , w przeciwieństwie do OX_2R , nie wiąże się z białkiem G niewrażliwym na toksynę krztuśca (PTX-niewrażliwym) – $G_{o/i}$, lecz obydwa receptory wchodzi w interakcje z jednym z białek wrażliwych na PTX (PTX-wrażliwym) – G_q [36]. Efekty działania sygnalizacji wewnątrzkomórkowej uruchamianej przez te dwa typy białek są przeciwne. Dysocjacja białka $G_{o/i}$ prowadzi w konsekwencji do hyperpolaryzacji neuronów przez działanie na kanały potasowe. Aktywacja białka G_q powoduje odwrotny efekt – depolaryzację komórki. Według wszystkich doniesień piśmiennictwa, oreksyny działając w sposób bezpośredni na neurony, wykazują w warunkach fizjologicznych efekt pobudzający i nie prowadzą do hyperpolaryzacji, nawet działając przez OX_2R .

Dzieje się tak dlatego, iż aktywacja obu wyżej wymienionych białek G, prowadzi sumarycznie do depolaryzacji komórki docelowej [20]. W trakcie prowadzenia badań na żywych neuronach, nie wykryto, aby oreksyny działały jedynie przez OX_2R połączony funkcjonalnie tylko z białkiem G_{oi} . Zarówno OX_1R jak i OX_2R wykazują wysoki stopień konserwatywności wśród wielu gatunków. Prawdopodobnie istnieją podtypy OX_1R i OX_2R wynikające z alternatywnego splicingu tych białek, nie różniące się jednak powinowactwem do ligandów [9]. Szczegółowe, molekularne podłoże działania oreksyn, można odnaleźć w pracy przeglądowej K. Biegańskiej i współpracowników, publikowanej na łamach tego czasopisma [3].

Dzięki szerokim badaniom wpływu oreksyn na różne funkcje ośrodkowego układu nerwowego, ustalono istotny wpływ oreksyn na wzbudzenie mózgowia (ang. *arousal*) [6], klasyfikując układ oreksynergiczny jako nadrzędny układ niespecyficzny mózgowia ssaków. Najbardziej znaną patologią tego układu jest narkolepsja, charakteryzująca się nadmierną sennością w ciągu dnia (ang. *Excessive Daytime Sleepiness*, EDS), a w skrajnych przypadkach nieoczekiwanym zasypianiem, chwilową utratą napięcia mięśniowego (katapleksją), czy porażeniem przysennym i omamami przysennymi [28, 34]. Wielość funkcji [13], pośrednio wynikających z niespecyficznego charakteru układu oreksynergicznego, wciąż zaskakuje badaczy, którzy proponują nowe miejsca komórkowej modulacji przez oreksyny. Celem pracy było zebranie dotychczasowych informacji na temat oreksyn, ze szczególnym naciskiem na molekularne mechanizmy oreksynowej modulacji neuronów ośrodkowego układu nerwowego.

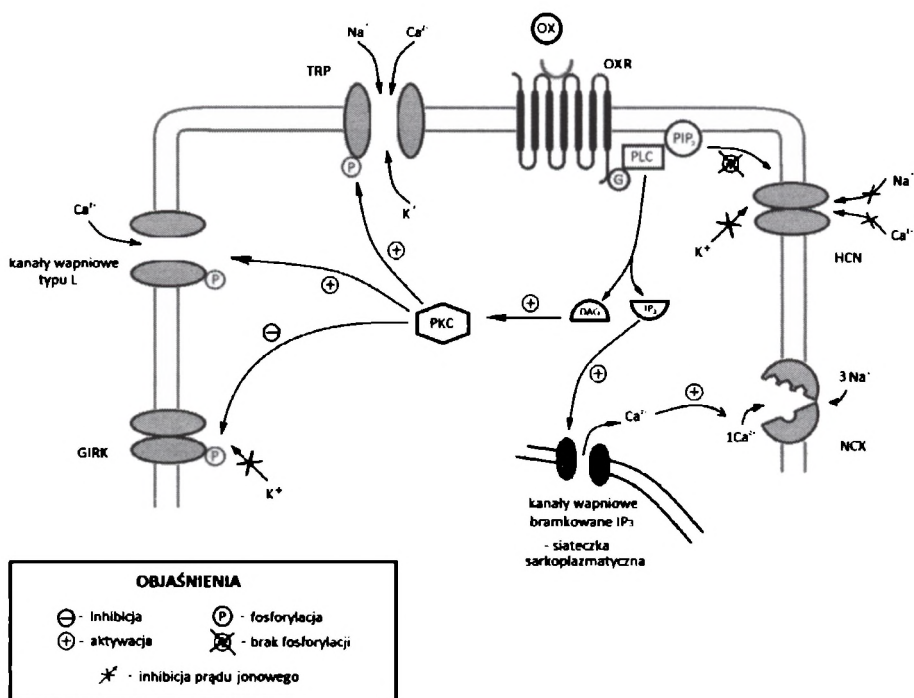
MECHANIZMY MOLEKULARNE DZIAŁANIA OREKSYN

Od czasu odkrycia oreksyn przez Sakurai i de Lecea w 1998 roku [10, 26], pojawiło się wiele artykułów podejmujących temat, możliwego wpływu tych peptydów na aktywność neuronalną różnych struktur w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) ssaków. W tej pracy opisujemy wyniki badań, bezpośredniego wpływu oreksyn na neurony ssaków, próbując naświetlić podstawowe mechanizmy, leżące u podłoża ich modulującej aktywności. W badaniach *in vivo* pojawiły się doniesienia o hamującym efekcie tych peptydów na aktywność badanych struktur. Najprawdopodobniej, był to jednak wynik pobudzającego działania oreksyn na neurony hamujące [27]. Żadna z publikacji dotyczących tego tematu, nie pokazała jednak bezpośredniego, hyperpolaryzującego działania oreksyn, dlatego w dalszej części tej pracy, przybliżony zostanie pobudzający efekt działania tych podwzgórzowych peptydów.

Pobudzające działanie oreksyn, może być spowodowane przez dwa różne typy ich aktywności. Część receptorów oreksynowych zlokalizowanych jest w błonie presynaptycznej. Oreksyny działając na te receptory mogą zwiększać prawdopodobieństwo uwalniania neuroprzekaźnika pobudzającego [18]. Większość receptorów

OX_1R , jak i OX_2R , podlega jednak ekspresji w błonie postsynaptycznej – zarówno w ciele komórkowym, jak i dendrytach. Przyłączenie liganda do receptora na błonie postsynaptycznej, może powodować depolaryzację neuronu poprzez oddziaływanie na wiele kanałów jonowych [7, 11, 12, 14, 16, 21, 22, 31, 32, 33], lub prowadzić do wzrostu pobudliwości komórek, modulując aktywność kanałów jonowych na wypustkach dendrytycznych [17].

Efekt działania oreksyn zależy od aktywacji ich receptorów (OXR), które należą do grupy receptorów sprzężonych z białkiem G, a więc receptorów metabotropowych. Aby zmiana konformacji receptora metabotropowego doprowadziła do efektu komórkowego, aktywowana jest wewnątrzkomórkowa droga sygnalizacyjna. Proponowany przez badaczy szlak sygnalizacyjny, zakłada aktywację fosfolipazy C (PLC) przez podjednostkę α białka G_q , co prowadzi do rozkładu jednego z błonowych fosfolipidów – fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu (PIP_2). Produkty jego rozkładu: inozytolo(1,4,5)trisfosforan (IP_3) oraz 1,2-diacyloglicerol (DAG) są wtór-



RYCINA 1. Mechanizm komórkowy modulacji aktywności kanałów jonowych przez oreksyny. DoC kładny opis w tekście

FIGURE 1. Cellular mechanism of the orexin modulation of ionic channels activity. For detailed information see the main text

nymi przekaznikami aktywującymi wiele ścieżek sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), która bezpośrednio fosforyluje wiele kanałów jonowych, umożliwiając przepływ jonów przez błonę komórkową, co prowadzi do zmiany jej polaryzacji (ryc. 1) [16, 33].

MECHANIZM DZIAŁANIA OREKSYN NA NIESPECYFICZNE KANAŁY JONOWE (NSCC)

Aktywność neuronalna zależy przede wszystkim od kinetyki (otwierania i zamykania) kanałów jonowych, które są białkowymi kompleksami w nieprzepuszczalnej błonie komórkowej, pasywnej dla cząsteczek naładowanych. Stan aktywacji tych białek zależy od wielu czynników, zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowych. Kanały jonowe można podzielić na wiele grup w zależności od mechanizmu ich bramkowania, przepuszczalności dla konkretnego rodzaju jonów, przewodności, czy podobieństw w sekwencji aminokwasowej. Bazując na tym założeniu, można wyodrębnić nadrodzinę nieselektywnych kanałów jonowych (NSCC), dla których wypadkowym prądem jonowym przepływającym przez światło kanału jest mieszanina prądów cząstkowych: sodowego, wapniowego i potasowego. Efektem aktywacji kanałów NSCC jest jednak depolaryzacja, która wynika z większego udziału prądu dokomórkowego w prądzie całościowym. Wyżej wymieniona charakterystyka dotyczy wszystkich „członków” nadrodziny omawianych kanałów, mimo ich odrębnego pochodzenia molekularnego. W obrębie obszernej nadrodziny NSCC można wyróżnić rodziny kanałów jonowych, takie jak: kanały *transient receptor potential* (TRP), kanały jonowe wrażliwe na kwasy (ASIC), nieselektywne kanały jonowe zależne od jonów wapnia (ICAN), czy kanały jonowe aktywowane hyperpolaryzacją i bramkowane cyklicznymi nukleotydami (HCN) [25].

W modulacji aktywności neuronów przez oreksyny, ważną rolę odgrywają kanały z rodziny TRP. Zostały one odkryte u muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, a następnie odnotowano ich konserwatywne występowanie w wielu organizmach: od drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, przez bezkręgowce, aż do kręgowców. Kanały TRP posiadają ekspresję w prawie wszystkich typach komórek, we wszystkich błonach z wyjątkiem błony jądrowej i mitochondrialnej. Rodzina TRP dzieli się na siedem podrodzin: TRPC (klasyczne TPR), TRPV (wanilloidowe TRP), TRPM (melastatynowe TPR), TRPP (policystynowe TRP), TRPML (mukolipinowe TRP), TRPA (ankirynowe TRP) i TRPN (inne od pozostałych TPR), te ostatnie zostały odnalezione jedynie u bezkręgowców i ryb. Cała rodzina cechuje się bardzo dużą różnością mechanizmów aktywacji, począwszy od bramkowania – ligandem i napięciem, czy wrażliwości na zmiany temperatury, a skończywszy na modulacji reszt nukleofilowych przez wiele czynników cytoplazmatycznych. Akty-

wowane kanały TRP powodują gwałtowny napływ prądu sodowo-wapniowego do komórki, przy jednoczesnym potasowym prądzie odkomórkowym, co w rezultacie powoduje depolaryzację komórki nerwowej [23].

Podrodzina kanałów TRPC została odkryta w latach 1995/96 przez zespół Abramowitz i Birnbaumer przy okazji prowadzenia badań nad zmianami przepływu prądów wapniowych w neuronach, przy aktywacji szlaku sygnalizacji komórkowej zależnego od białka G_q i fosfolipazy $C\beta$ (PLC β) [5]. Odkryte kanały okazały się być nieselektywnie przepuszczalne dla jonów wapnia, sodu i potasu, a także powodowały zarówno dkomórkowy prąd wapniowy, jak i depolaryzację komórki. Ponieważ nowo odkryte kanały wykazywały duże podobieństwo do kanałów z rodziny TRP, wyodrębniono osobną podrodzinę nazwaną później – klasyczne TRP (TRPC). Ten sam zespół scharakteryzował siedem rodzajów kanałów TRPC, które występują zarówno w postaci homo-, jak i heterodimerów. Co najciekawsze, TRPC1, 3 i 6 aktywowane są pod wpływem oreksyn na komórkę posiadającą koekspresję OXR i TRPC [1].

Kanały TRPC okazały się jednym z ważniejszych szlaków modulacji aktywności neuronalnej przez oreksyny. Najdokładniejsze badania proponują ścieżkę sygnalizacyjną, która prowadzi od OXR do aktywacji TRPC. Wykazano, że oreksyny aktywują prądy przez NSCC (tzw. „noisy cationic current”) w takich strukturach mózgowia ssaków jak: miejsce najdalsze (ang. *area postrema*) [31], czy skorupa jądra półleżącego (ang. *shell of nucleus accumbens*) [21]. W grzbietowych jądrach szwu (ang. *dorsal raphe nuclei*) oraz w grzbietowo-bocznej nakrywce (ang. *ventrolateral tegmentum nuclei*), neurony pobudzane przez oreksyny, aktywowane są prądem przez kanały NSCC, jak i wapniowym przez kanały wapniowe typu L [14]. Udział tych dwóch mechanizmów stwierdzono również w sztucznie indukowanych komórkach neuronalnych, wyprowadzonych z linii oocytów chomika chińskiego [23]. Tym samym potwierdzono udział PLC w aktywowaniu szlaku komórkowego, prowadzącego do efektów modulacji przez oreksyny, czyli depolaryzacji komórki docelowej. W jądrze pasma samotnego (ang. *nucleus of the solitary tract*), oreksyny wykorzystują mechanizm aktywacji NSCC przy jednoczesnym hamowaniu prądu potasowego I_K [32]. Proponowana ścieżka sygnalizacji przebadana przy użyciu selektywnych blokerów kinaz, potwierdza szlak wyznaczony przez odkrywców TRPC. W wypadku tych kanałów, fosforylacja przez aktywną kinazę powoduje zwiększenie prawdopodobieństwa otwarcia kanału, a tym samym wpływa na powstanie depolaryzującego prądu dkomórkowego (ryc. 1).

Kanały jonowe aktywowane hyperpolaryzacją i bramkowane cyklicznymi nukleotydami (HCN) są jednymi z nadrodziny NSCC, ponieważ przepływa przez nie prąd jonowy złożony z prądu wapniowego, sodowego i potasowego. Ciekawą cechą tych kanałów jest ich aktywacja w czasie dużej hyperpolaryzacji (zależnie od rodza-

ju kanału od -70 do -100 mV). Otwarcie ich pozwala komórce wrócić do potencjału spoczynkowego, dzięki przepływającemu przez HCN prądowi I_h , mającemu właściwości depolaryzujące (przewaga składowego prądu sodowego i wapniowego nad potasowym). Odkryto 4 rodzaje kanałów HCN: odpowiednio HCN1-4. Każdy z czterech rodzajów tworzy homotetramery, o odmiennych właściwościach fizykochemicznych. Kanały HCN1 i 3 bramkowane są przede wszystkim przez PIP_2 , który podnosi ich próg aktywacji o około 20 mV. HCN2 i 4 zależne są głównie od cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP), który podnosi ich próg aktywacji od 10 do 25 mV. Wszystkie kanały z tej rodziny mogą być regulowane również przez wiele innych czynników wewnątrzkomórkowych, takich jak fosforylacja przez kinazy białkowe [29].

Jedną z ważniejszych funkcji kanałów HCN jest udział w integracji dendrytycznej, odpowiedzialnej za modulowanie pobudliwości komórki nerwowej. Zagadnienie to zostało szczegółowo przebadane w neuronach hipokampa i komórkach piramidowych kory. Kanały HCN są zlokalizowane gradientowo na całej powierzchni błony komórkowej wypustek dendrytycznych. Co ciekawe, w komórkach hipokampa, gradient ten jest odwrócony, w stosunku do neuronów piramidowych kory. Aktywacja prądu I_h działa więc jak filtr przestrzenny, który obniża aktywność wejść synaptycznych zlokalizowanych na dystalnych częściach dendrytów komórek hipokampa. W komórkach kory, efekt ten jest odwrotny. Z drugiej strony mechanizmy dezaktywujące prądy przez kanały HCN, mogą służyć jako nieselektywny wzmacniacz pobudliwości neuronów, prowadzący do ich depolaryzacji. W taki właśnie sposób działają oreksyny [4, 29].

Mechanizm modulacji przez oreksyny kanałów HCN badano w warstwie V (piramidowej) kory przedlimbiczej (ang. *prelimbic cortex*) mózgu myszy, będącej homologiem kory przedczołowej (ang. *prefrontal cortex*) naczelnych. Aktywacja gradientowo ułożonych kanałów HCN na dendrytach, powoduje zmniejszenie pobudliwości tych neuronów. Udowodniono, że oreksyny są funkcjonalnie zaangażowane w aktywność tych kanałów, a efektem ich działania jest dezaktywacja prądów przez HCN. Co więcej, wykazano, że wykorzystywana ścieżka sygnałowa, prowadząca od receptora do kanału jest zależna od PKC [17].

Istnieją dwa możliwe wytłumaczenia mechanizmu, który leży u podstaw wyżej opisanego zjawiska. Jednym z nich jest bezpośrednia fosforylacja kanału przez PKC, powodująca zwiększenie prawdopodobieństwa jego zamknięcia [17]. Drugi mechanizm odpowiadający za dezaktywację kanału, to brak PIP_2 , który jest rozkładany przez aktywną PLC. Obecność PIP_2 jest czynnikiem bramkującym kanały HCN1 i 3, a to właśnie kanały HCN1 odgrywają najważniejszą rolę w regulacji pobudliwości komórki przez modulację integracji dendrytycznej (ryc. 1) [29].

DZIAŁANIE OREKSYN NA KANAŁY POTASOWE

Kanały potasowe są bardzo ważne w utrzymaniu polaryzacji błony komórek nerwowych w spoczynku na odpowiednim poziomie. Są też celem modulacji wielu neuroprzekaźników i neuromodulatorów. Neurony OUN ssaków posiadają ekspresję wielu rodzajów kanałów potasowych, które można podzielić na trzy istotne grupy, biorąc pod uwagę mechanizm ich modulacji przez neuroprzekaźniki. Pierwszą z nich stanowią kanały potasowe zależne od jonów wapnia (K_{Ca}) lub jonów sodu (K_{Na}). Kolejną grupę stanowią prostownicze kanały potasowe, do której zalicza się kanały zależne od białka G (GIRK). Ostatnią grupą są kanały potasowe bramkowane napięciem (K_V), które funkcjonalnie można podzielić na dwie podgrupy, charakteryzując rodzaj przepływającego przez nie prądu: I_K – prąd ciągły (*sustained*) oraz I_A – prąd krótkotrwały (*transient*).

Badania pokazują wpływ oreksyn na aktywność wielu rodzajów kanałów potasowych [12, 22, 32, 36]. Ponieważ oreksyny w licznych obszarach mózgowia zmieniają opór błony komórkowej, można wnioskować, że modulacja przez te peptydy polega na zamykaniu pewnej populacji kanałów jonowych. Dalsze badania wykazały, że OX-A i OX-B powodują zmniejszenie odkomórkowych prądów potasowych przez szereg kanałów, depolaryzując neurony docelowe i zwiększając częstotliwość generowanych potencjałów czynnościowych, poprzez skrócenie fazy repolaryzacji [35].

Pierwsze badania pokazujące wpływ oreksyn na depresję prądu potasowego przez K_V oraz różnicującą modulację konkretnego typu prądu, zostały opublikowane przez Yang i Ferguson w 2003 roku. Badacze wykazali, że w jądrze pasma samotnego (ang. *Nucleus of the Solitary Tract*, NTS) oreksyny hamują odkomórkowy prąd I_K , nie wywierając wpływu na prąd I_A [32]. Zaproponowali także mechanizm hamowania tego prądu przez oreksyny. Wykazali, że oreksyny działają przez białko G, które aktywuje kaskadę przekazywania sygnału komórkowego zależnego od kinazy białkowej C (PKC), lecz niezależnego od kinazy białkowej A (PKA) [33]. Identyczny efekt działania peptydów zaobserwowali badacze w miejscu sinawym (ang. *Locus Coeruleus*, LC) [22], a także w skorupie jądra półleżącego (ang. *Shell of the Nucleus Accumbens*, NAcSh) [21].

Kanały potasowe zaangażowane są również w powstawanie potencjałów czynnościowych. Szczególny udział tych kanałów można zaobserwować w końcowej fazie potencjału czynnościowego, zwanej hyperpolaryzacją następczą (AHP), w której potencjał błonowy osiąga wartości niższe od potencjału spoczynkowego neuronu. W tworzeniu się tej komponenty bierze udział wiele kanałów jonowych, takich jak kanały wapniowe, potasowe zależne od sodu (K_{Na}), czy potasowe zależne od wapnia (K_{Ca}). K_{Ca} ze względu na ich właściwość można podzielić na kanały potasowe zależne od wapnia o małej przewodności (SK_{Ca}), oraz te o dużej przewodności (BK_{Ca}). AHP można podzielić na następujące po sobie fazy: szybką (fAHP), średnią

(mAHP) i wolną (sAHP), a każda z tych faz posiada odrębną charakterystykę prądową. Szybka pojawia się od razu po iglicy i aktywowane są w niej kanały BK_{Ca} , których otwarcie prowadzi do dużej hyperpolaryzacji. Następnie rozpoczyna się faza średnia, w której otwierają się niewrażliwe na napięcie SK_{Ca} . Ostatnia, wolna faza, odgrywa bardzo ważną rolę w procesie modulacji kształtu potencjałów czynnościowych przez różne neuroprzekaźniki. sAHP jest wrażliwa na stężenie jonów wapnia i sodu, poprzez udział w niej zarówno kanałów K_{Ca} jak i K_{Na} oraz wielu typów kanałów wapniowych [24]. Co ciekawe, na skrócenie tej fazy, a tym samym na wzrost częstotliwości potencjałów czynnościowych, mają wpływ wtórne przekaźniki takie jak cykliczny adenozynomonofosforan (cAMP), czy PKC. Wykazano, że w przykomorowym jądrze wzgórza (ang. *Paraventricular nucleus of the Thalamus*, PVT) oreksyny modulują aktywność neuronów, wpływając właśnie na skracanie fazy wolnej hyperpolaryzacji następczej, aktywując ścieżkę sygnalizacyjną zależną od PKC, lecz niezależną od PKA [35].

Komunikacja między komórkami, wymaga pośrednictwa cząsteczek trans-miterów takich jak lipidy, aminy, białka czy peptydy. Wiele z nich łączy się z receptorami, będącymi członkami rodziny receptorów współpracujących z białkiem G – heterotrimerem złożonym z podjednostek α , β oraz γ . Przyłączenie liganda do receptora, prowadzi do zmiany konformacji białka receptorowego, a to prowadzi do wymiany guanozynodifosforanu (GDP) na guanozynotrifosforan (GTP) przy podjednostce $G\alpha$ i w rezultacie do dysocjacji podjednostki $G\alpha$ od $G\beta\gamma$. Podjednostka $G\beta\gamma$ PTX-wrażliwych białek G bierze udział w modulacji kanałów zależnych od białka G, takich jak GIRK, ponieważ przyłączenie $G\beta\gamma$ do wewnątrzkomórkowej części kanału prowadzi do jego otwarcia. W ten sposób GIRK kontrolowane są przez neuroprzekaźniki hamujące, takie jak kwas gamma-aminomastowy (GABA), który powoduje otwarcie kanału, odkomórkowy prąd potasowy i hyperpolaryzację neuronu [20]. Podjednostka $G\alpha$ PTX-niewrażliwych białek G, prowadzi natomiast do uruchomienia wielu szlaków komórkowych, które finalnie mogą doprowadzić do fosforylacji pewnych kanałów w błonie komórkowej. Przykładem peptydów działających przez receptory związane z białkiem G_q (PTX-niewrażliwym) są oreksyny [36]. OX-A lub OX-B wiążąc się do receptora, uruchamia kaskadę wewnątrzkomórkową prowadzącą do fosforylacji GIRK, zwiększenia prawdopodobieństwa zamknięcia kanału, a tym samym do blokady odkomórkowego prądu potasowego i depolaryzacji komórki. Na przestrzeni ostatnich lat, ukazały się prace dotyczące wpływu oreksyn na wybrane struktury OUN, opisujące właśnie ten mechanizm modulacji aktywności neuronalnej. Mechanizm proponowany przez badaczy, to uruchomienie ścieżki sygnalizacyjnej białko G-PLC-PKC, opisaną we wcześniejszym rozdziale. Uruchomienie tego mechanizmu prowadzi również do rozkładu czynnika bramkującego kanały GIRK, jakim jest PIP_2 , a tym samym do zamknięcia tych kanałów (ryc. 1) [12].

WPLYW OREKSYN NA WEWNĄTRZKOMÓRKOWE STĘŻENIE JONÓW WAPNIA

Kanały wapniowe pełnią ważną rolę zarówno w prawidłowym funkcjonowaniu komórek, jak też mogą być przyczyną wielu stanów patologicznych. Wapń, jako jeden z wtórnych przekazników, uruchamia wiele kaskad sygnałowych wewnątrz komórki i jest często niezbędny do transmisji sygnału z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Dlatego też regulacja napływu jonów wapnia do cytoplazmy, zarówno z zewnątrz komórki, jak i z magazynów wewnątrzkomórkowych – siateczki sarkoplazmatycznej (SER), jest konieczna do prawidłowego funkcjonowania pobudliwych komórek nerwowych [8].

Badania nad kanałami wapniowymi bramkowanymi napięciem rozpoczęły się już w latach 80' XX wieku, kiedy to badacze próbowali zrozumieć zjawiska fizyczne występujące w neuronach zmysłowych. Scharakteryzowali wtedy dwa rodzaje obserwowanych prądów wapniowych, zależnych od napięcia. Pierwszy podział, dziś nadrzędny, wyróżnia prądy wapniowe aktywowane niskim napięciem (ang. *Low Voltage Activity*, LVA) i prądy wapniowe aktywowane wysokim napięciem (ang. *High Voltage Activity*, HVA). W obrębie drugiej grupy scharakteryzowano wiele podgrup w zależności od rodzaju prądu, jego biofizycznych właściwości, czasu trwania, czy w końcu występowania w różnych rodzajach komórek nerwowych [8].

Pierwszym z odkrytych komponentów HVA był prąd wapniowy typu L (ang. *long lasting* – długotrwały). Zidentyfikowano go nie tylko w neuronach, ale także w prawidłowej pracy złącz nerwowo-mięśniowych i przesyłania potencjału wzdłuż T-tubul [8]. W komórkach nerwowych kanały wapniowe typu L są modulowane za pośrednictwem wielu neuroprzekazników, w tym również oreksyn [14, 30].

Bardzo ważnym rodzajem prądów wapniowych jest prąd wapniowy typu T (ang. *transient* – krótkotrwały). Prąd ten występuje w komórkach charakteryzujących się występowaniem tak zwanych „paczek potencjałów” (ang. *burst*) i to dzięki niemu obserwuje się niskoprogowe potencjały wapniowe (LTS). Kanały typu T są jednym z nowych obiektów badań, dotyczących modulacji przez oreksyny. Badacze wykazali oddziaływanie tych neuropeptydów na prąd wapniowy typu T w komórkach jądra przykomorowego wzgórza (PVT), które jest gęsto unerwione przez zakończenia neuronów oreksynergicznych [35].

Następnie przy użyciu rozmaitych selektywnych blokerów, odkryto prądy wapniowe inne niż prąd typu L, bazując na ich właściwościach biofizycznych. Są to: prąd wapniowy typu N („nie-typu-L” lub neuronalny), prąd wapniowy typu P (odnaleziony w komórkach Purkiniego), czy prąd wapniowy typu Q (zazwyczaj występujący razem z prądem typu P – stąd często używana nazwa prąd P/Q) [8].

Napływ jonów wapnia do komórki jest jednym z mechanizmów modulacji aktywności neuronów docelowych przez oreksyny. Oreksyny mogą wpływać na zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia nie tylko poprzez akty-

wację kanałów TRPC, lecz również przez działanie na kanały selektywnie przewodzące dkomórkowy prąd wapniowy. Przykładem, najlepiej opisanego w literaturze wpływu oreksyn na kanały wapniowe jest aktywacja kanałów wapniowych typu L.

Badacze zajmujący się tym zagadnieniem, zaproponowali mechanizm wewnątrzkomórkowej aktywacji kanałów wapniowych typu L, która w sztucznie indukowanych komórkach neuronalnych [19] nie różni się, od tej obserwowanej w doświadczeniach na skrawkach mózgu *in vivo* [16]. Model zakłada klasyczny szlak białko G-PLC-PKC, kończący się fosforylacją kanału wapniowego typu L, czyli zmianą jego konformacji, zwiększającej prawdopodobieństwo otwarcia światła kanału. W ten sposób oreksyny zwiększają populacje otwieranych kanałów w odpowiedzi na stymulację napięciową (ryc. 1).

Tą metodę modulacji aktywności neuronalnej odkryto w takich strukturach mózgu, jak kora przedczołowa [30], grzbietowe jądra szwu i grzbietowo-boczne jądro nakrywki (wraz z aktywacją NSCC) [14]. Dzięki temu mechanizmowi oreksyny mogą modulować funkcje kognitywne oraz te związane ze wzbudzeniem (ang. *arousal*) całego mózgowia.

Ważną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów wapnia odgrywa wymiennik sodowo-wapniowy (NCX). NCX to białko o dziewięciu domenach transbłonowych, występujące zarówno w OUN, jak i w sercu. W mózgu występuje w trzech odmianach (NCX1, 2 i 3), natomiast w sercu odkryto jedynie formę pierwszą (NCX1). Wymiennik może pracować w dwóch trybach, zależnie od różnicy stężeń jonów wapnia z obu stron błony komórkowej. W czasie gdy błona komórkowa jest w potencjale spoczynkowym i następuje nagły napływ jonów wapnia do cytoplazmy, NCX, chcąc przywrócić stan równowagi, działa w trybie przednim (*forward mode*), wyrzucając z cytoplazmy jeden dwudodatni jon wapnia, w zamian za trzy jednododatnie jony sodu pompowane do wnętrza. W tym trybie, w cytoplazmie gromadzony jest ładunek dodatni – wymiennik ma charakter elektro-geniczny. Podczas dużej depolaryzacji, na przykład w czasie nadstrzału potencjału czynnościowego, wymiennik działa w trybie wstecznym (*reverse mode*), wymieniając jony wapnia i sodu w odwrotnych kierunkach. Ten antyport może odgrywać ważną rolę w fizjologii neuronów, a jego dysfunkcja może towarzyszyć przebiegowi wielu chorób neurodegeneracyjnych [2].

Badania wskazują, że oreksyny mogą wykorzystywać wymiennik sodowo-wapniowy, jako potencjalny efektor szlaku sygnalizacyjnego, uruchamianego przez białko G połączone z OXR. Efektem uruchomienia takiej ścieżki jest depolaryzacja komórki, przez dkomórkowy prąd sodowy przeciwstawiający się odkomórkowemu prądowi wapniowemu. W tym wypadku, rola NCX nie sprowadza się jednie do utrzymania równowagi jonów wapnia w cytoplazmie neuronu, lecz do depolaryzacji komórki. Mechanizm ten może być jedynym, uruchamianym przez oreksyny, tak jak to jest w komórkach GABA-ergicznych jądra łukowatego (ang. *Arcuate nucleus, ARC*), odpowiedzialnego za integrację sygnałów metabolicznych całego

organizmu. Odkrycie w 2003 roku, bezpośredniego, postsynaptycznego działania oreksyn na ARC jest bardzo ważne w zrozumieniu modulacyjnego wpływu tych neuropeptydów na zachowania związane z pobieraniem pokarmu. Poznanie mechanizmu tego oddziaływania, z prądem jonowym przepływającym przez NCX, dało podstawę do dalszych badań [7].

Dwa lata wcześniej odkryto udział NCX w modulacji aktywności neuronów przez oreksyny, w jądrze guzowo-suteczkowatym (ang. *Tuberomammillary Nucleus*, TMN), jednak jest to tylko jeden z dwóch mechanizmów odpowiedzialnych za całkowitą depolaryzację w tych komórkach. W neuronach TMN bowiem, oreksyny oprócz NCX, aktywują również kanały wapniowe. Prąd przepływający przez te kanały, może aktywować wymiennik, zgodnie z mechanizmem proponowanym przez autorów [11]. Oreksyny działając na OXR, aktywują białko G, które z kolei działa na PLC. Substratem reakcji prowadzonej przez fosfolipazę C jest PIP_2 , którego produktami rozkładu są DAG i IP_3 . Wysokie stężenie DAG jest dodatnio skorelowane z aktywnością NCX. Nie wiadomo jednak, czy DAG działa bezpośrednio na wymiennik, przez aktywację PKC, czy jest produktem ubocznym reakcji, w której to IP_3 pełni zasadniczą rolę. IP_3 otwiera kanały wapniowe znajdujące się w błonie siateczki sarkoplazmatycznej (SER), będącej wewnątrzkomórkowym magazynem jonów wapnia. Prąd wapniowy skierowany z SER do cytozolu, powoduje zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, a tym samym aktywację wrażliwego na zmiany w poziomie jonów wapnia, NCX. Aktywacja dokomórkowych prądów wapniowych przez kanały w błonie komórkowej, może wzmacniać efekt tej ścieżki sygnalizacyjnej poprzez zwiększenie cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia, a tym samym aktywację większej populacji NCX (ryc. 1) [2, 11].

PODSUMOWANIE

Oreksyny, nowoodkryte pobudzające neuropeptydy podwzgórza, odgrywają niezwykle znaczącą funkcję w mózgowiu ssaków. OX-A oraz OX-B po przyłączeniu się do swoich receptorów: OX_1R i OX_2R , są w stanie modulować aktywność neuronów docelowych w obrębie prawie całego mózgowia ssaków, mając tym samym bardzo istotną rolę zarówno w fizjologii, jak i wielu stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego. Ekspresja receptorów oreksynowych wraz z analizą rozległego unerwienia mózgowia przez komórki oreksynergiczne zlokalizowane w LHA, potwierdza niespecyficzny charakter tego bardzo konserwatywnego układu.

Oreksyny modulują pracę neuronów poprzez oddziaływanie na rozmaite ścieżki sygnalizacyjne, co prowadzi do wpływu na stan otwarcia wielu kanałów jonowych w błonie komórkowej. Przykładami zbadanych mechanizmów molekularnych są:

aktywacja prądów przez nieselektywne kanały kationowe (NSCC) z rodziny TPR, czy zamykanie kanałów jonowych aktywowanych hyperpolaryzacją i bramkowanych cyklicznymi nukleotydami (HCN). Innym działaniem oreksyn jest zamykanie kanałów potasowych (w tym kanałów prostowniczych zależnych od białka G; GIRK), otwieranie kanałów wapniowych zależnych od napięcia (Ca_v) czy aktywacja wymiennika sodowo-wapniowego (NCX). Wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny, prowadzący do wyżej wymienionych efektów, został dokładnie opisany i jest to ścieżka białko G-PLC-PKC (ryc. 1).

Praca ta jest podsumowaniem 15 lat badań dotyczących mechanizmów komórkowych, uruchamianych przez jedno z ważniejszych modulatorów aktywności neuronalnej mózgowia ssaków. Oreksyny, jako potencjalny środek farmaceutyczny, pozostają gorącym tematem w zakresie badań naukowców, zajmujących się zarówno fizjologią, jak i stanami patologicznymi zwierząt i ludzi. Ciągłe „świeży” temat, rozwija się w zaskakującym tempie, czego dowodem jest prawie 3 tysiące publikacji, dotyczących układu oreksynergicznego.

LITERATURA

- [1] ABRAWOWITZ J, BIRNBAUMER L. Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J* 2009; **23**(2): 297-328.
- [2] ANNUNZIATO L, PIGNATARO G, DI RENZO GF. Pharmacology of brain Na^+/Ca^{2+} exchanger: From molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev* 2004; **56**(4): 633-654.
- [3] BIEGAŃSKA K, URBĄSKA A, WOLDAN-TAMBOR A, ZAWILSKA JB. Hipokretyny (oreksyny) i receptory hipokretynowe: struktura, rozmieszczenie i molekularne podłoże działania. *Postepy Biol Kom* 2011; **38**: 333-348.
- [4] BIEL M, WAHL-SCHIOTT C, MICHALAKIS S, ZONG X. Hyperpolarisation-activated cation channels: From genes to function. *Physiol Rev* 2009; **89**: 847-855.
- [5] BIRNBAUMER L, ZHU X, BIRNBAUMER M. On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 15195-15202.
- [6] BOUTREL B, DE LECEA L. Addiction and arousal: the hypocretin connection. *Physiol Behav* 2008; **93**(4-5): 947-951.
- [7] BURDAKOV D, LISS B, ASHCROFT FM. Orexin excites GABAergic neurons of the arcuate nucleus by activating the sodium-calcium exchanger. *J Neurosci* 2003; **23**(12): 4951-4957.
- [8] CATTERALL WA. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; **3**(8): a003947.
- [9] CHEN J, RANDEVA HS. Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol* 2004; **18**: 2790-2804.
- [10] DE LECEA L. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 322-327.
- [11] ERIKSSON KS, SERGEEVA O, BROWN RII, HAAS IIL. Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J Neurosci* 2001; **21**(23): 9273-9279.
- [12] HOANG QV, ZHAO P, NAKAJIMA S, NAKAJIMA Y. Orexin (hypocretin) effects on constitutively active inward rectifier K^+ channels in cultured nucleus basalis neurons. *J Neurophysiol* 2004; **92**: 3183-3191.
- [13] JAWIARCZYK A, BOŁANOWSKI M. Oreksyny – neuropeptydy o działaniu plejotropowym. *Endokrynol Otyłość* 2010; **6**(3): 147-153.

- [14] KOHLMEIER KA, WATANABE S, TYLER CJ, BURTLET S, LEONARD CS. Dual orexin actions on dorsal raphe and laterodorsal tegmentum neurons: noisy cation current activation and selective enhancement of Ca^{2+} transient mediated by L-type calcium channels. *J Neurophysiol* 2008; **100**: 2263-2281.
- [15] KUKKONEN JP. Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; **304**(1): C2-32.
- [16] LARSSON P, PELTONEN HM, AKERMAN KEO. Orexin-A-induced Ca^{2+} Entry – Evidence for involvement of TRPC channels and protein kinase C regulation. *J Biol Chem* 2005; **280**(3): 1771-1781.
- [17] LI B, CHEN F, YE J, CHEN X, YAN J, LI Y, XIONG Y, ZHOU Z, XIA J, HU Z. The modulation of orexin A on HCN currents of pyramidal neurons in mouse prelimbic cortex. *Cereb Cortex* 2010; **20**(7): 1756-1767.
- [18] LI Y, GAO XB, SAKURAI T, VAN DEN POL AN. Hypocretin/orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron – A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron* 2002; **36**: 1169-1181.
- [19] MAGGA J, BART G, OKER-BLOM C. Agonist potency differentiates G protein activation and Ca^{2+} signaling by the orexin receptor type 1. *Biochem Pharmacol* 2006; **71**(6): 827-836.
- [20] MARK MD, HERLITZE S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K^{+} channels. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 5830-5836.
- [21] MUKAI K, KIM J, NAKAJIMA K, OOMURA Y, WAYNER MJ, SASAKI K. Electrophysiological effects of orexin/hypocretin on nucleus accumbens shell neurons in rats: An in vitro study. *Peptides* 2009; **30**: 1487-1496.
- [22] MURAI Y, AKAIE T. Orexins cause depolarization via nonselective cationic and K^{+} channels in isolated locus coeruleus neurons. *Neurosci Res* 2005; **51**: 55-56.
- [23] NILIUS B, OWSIANIK G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 2011; **12**: 218.
- [24] PEDARZANI P, STOCKER M. Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 3196-3217.
- [25] PENA F, ORDAZ B. Non-selective cation channel blockers: potential use in nervous system basic research and therapeutics. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2008; **8**: 812-819.
- [26] SAKURAI T, AMEMIYA A. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; **92**: 573-585.
- [27] SHIRAIISHIA T, OOMURAB Y, SASAKIC K, WAYNERD MJ. Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons. *Physiol Behav* 2000; **71**: 251-261.
- [28] SORENSEN GL, KNUDSEN S, JENNUM P. Sleep transitions in hypocretin-deficient narcolepsy. *Sleep* 2013; **36**(8): 1173-1177.
- [29] WAHL-SCHOTT C, BIEL M. HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 470-494.
- [30] XIA JX, FAN SY, YAN J, CHEN F, LI Y, YU ZP, HU ZA. Orexin A-induced extracellular calcium influx in prefrontal cortex neurons involves L-type calcium channels. *J Physiol Biochem* 2009; **65**(2): 125-136.
- [31] YANG B, FERGUSON AV. Orexin-A depolarizes dissociated rat area postrema neurons through activation of a nonselective cationic conductance. *J Neurosci* 2002; **22**(15): 6303-6308.
- [32] YANG B, FERGUSON AV. Orexin-A depolarizes nucleus tractus solitarius neurons through effects on non-selective cationic and K^{+} conductance. *J Neurophysiol* 2003; **89**: 2167-2175.
- [33] YANG B, SAMSON WK, FERGUSON AV. Excitatory effects of orexin-A on nucleus tractus solitarius neurons are mediated by phospholipase C and protein kinase C. *J Neurosci* 2003; **23**(15): 6215-6222.
- [34] ZAWILSKA JB. Narcolepsy: etiology, clinical features, diagnosis and treatment. *Postepy Hig Med Dosw* 2012; **66**: 771-786.

- [35] ZHANG L, KOLAJ M, RENAUD L. Ca^{2+} -dependent and Na^{+} -dependent K^{+} conductances contribute to a slow AHP in thalamic paraventricular nucleus neurons: a novel target for orexin receptors. *J Neurophysiol* 2010; **104**(4): 2052-2062.
- [36] ZHU Y, MIWA Y, YAMANAKA A. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci* 2003; **92**: 259-266.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 22.05.2013

Przyjęto: 20.08.2013

Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii, Instytut Zoologii

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Uniwersytet Jagielloński

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: +48-12 664-53-73

e-mail: marian.lewandowski@uj.edu.pl

